



*Różnorodność gatunkowa Microsporidia
u wybranych stawonogów hematofagicznych
i wpływ obecności mikrosporydiów
na mikrobiom gospodarza*

Artur Trzebny

Rozprawa doktorska

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 2022

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. UAM dr hab. Mirosławy Dabert

Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Promotor,
prof. UAM dr hab. Mirosławie Dabert za nieocenioną pomoc
udzieloną w trakcie przygotowania rozprawy doktorskiej,
cierpliwość, wsparcie i wyrozumiałość oraz motywację
do rozwoju naukowego i zawodowego.*

*Dziękuję wszystkim członkom zespołu Laboratorium Techniki
Biologii Molekularnej, którzy zawsze i bez wahania służyli mi
radą oraz pomocą.*

*Szczególne podziękowania składam moim najbliższym –
rodzinie oraz przyjaciołom za okazane wsparcie przy
realizacji moich celów naukowych.*

STRESZCZENIE

Mikrosporydia to wewnątrzkomórkowe, obligatoryjne pasożyty, infekujące szerokie spektrum gospodarzy. Około 15% z nich infekuje komary (Culicidae), będące również gospodarzami wielu patogenów kręgowców. Stawonogi hematofagiczne, takie jak komary i kleszcze (Ixodidae) są najważniejszymi wektorami czynników chorobotwórczych. Stąd, mikrosporydia infekujące te stawonogi stanowią bardzo dobry model do badania oddziaływań ekologicznych między patogenami, jak i składnikami mikrobiomu gospodarza. Celem mojej pracy doktorskiej była próba odpowiedzi na pytania: (1) jaka jest faktyczna różnorodność gatunkowa mikrosporydiów u tych gospodarzy; (2) czy mikrosporydia współwystępujące u tego samego gospodarza oddziałują na siebie; oraz (3) czy infekcja mikrosporydiami wpływa na mikrobiom gospodarza. W celu wykrycia mikrosporydiów opracowałem wysokowydajną metodę, którą wykorzystałem do określenia różnorodności gatunkowej tych pasożytów w badanych modelach. Moje wyniki wskazują, że komary są częstymi gospodarzami mikrosporydiów, spośród których większość jest pasożytami poliksenicznymi. Odnotowałem również relatywnie dużą częstość współwystępowania różnych mikrosporydiów, co skutkowało wzajemnymi oddziaływaniami między koinfekującymi gatunkami. Dodatkowo, stwierdziłem, że infekcja mikrosporydiami prowadzi do zmian w składzie mikrobiomu gospodarza oraz aktywności jego szlaków metabolicznych, głównie w kierunku syntezy antybiotyków i nukleotydów. Wśród kleszczy żerujących zidentyfikowałem tylko jeden gatunek mikrosporydium, który występował ze znikomą prevalencją, co sugeruje, że kleszcze mogły wykształcić mechanizm obronny przeciwko tym patogenom. Wyniki mojej pracy doktorskiej stwarzają nowe możliwości badań w obszarze ekologii pasożytów i mogą mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej.

Słowa kluczowe: Culicidae, funkcjonalność metagenomu, *Ixodes ricinus*, koinfekcje, metabarkoding DNA

ABSTRACT

Microsporidians are a group of intracellular obligate parasites that infect a wide range of hosts. About 15% of them infect mosquitoes (Culicidae), which are themselves hosts of many pathogens of vertebrates. In fact, the hematophagous arthropods, such as mosquitoes and ticks (Ixodidae) are the most important disease vectors. Therefore, microsporidians infecting these arthropods are a very good model to study ecological interactions between both pathogens and the other components of the host microbiome. The aim of my dissertation was to attempt to answer the questions: (1) what is the actual microsporidian species diversity in these hosts; (2) whether the microsporidians co-occurring in the same host individual interact with each other; and (3) whether the microsporidian infection affects the host's microbiome. To detect microsporidians, I developed a high-throughput method, which I used to determine their species-diversity in the tested models. My results demonstrate that mosquitoes are common hosts of numerous microsporidian species, and most of that species are polyxenic parasites. I also noted a relatively high level of the co-occurrences of different microsporidians in mosquitoes, which resulted in interactions between the co-infecting species. Additionally, I found that microsporidian infection leads to changes in the composition of the host microbiome and activities of the microbiome metabolic pathways; especially it concerns the synthesis of antibiotics and nucleotides. Among host-seeking ticks, I identified only one microsporidian species that occurred with negligible prevalence, which indicates that ticks probably have developed a defense mechanism against these pathogens. Results of my dissertation provide new opportunities in such research areas as ecology of parasites and medical diagnostics.

Key words: Culicidae, metagenome functional content, *Ixodes ricinus*, co-infections, DNA metabarcoding

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	6
WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU	7
AUTOREFERAT	9
THESIS OUTLINE.....	19
LITERATURA.....	28
PUBLIKACJA: <i>A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae)</i>	35
Materiał uzupełniający	55
Oświadczenia autorów	75
MANUSKRYPT: <i>Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species</i>	80
Materiał uzupełniający	101
Oświadczenia autorów	115
PUBLIKACJA: <i>Microsporidian infection in mosquitoes (Culicidae) is associated with gut microbiome composition and predicted gut microbiome functional content</i>	118
Materiał uzupełniający	136
Oświadczenia autorów	155
PUBLIKACJA: <i>Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (Ixodes ricinus)</i>	159
Materiał uzupełniający	171
Oświadczenia autorów	175
FINANSOWANIE	179

WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

1. Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) *A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae)*. Molecular Ecology Resources 20 (6) 1486-1504.
DOI: 10.1111/1755-0998.13205
Q1 (WoS), 97% (SCOPUS), IF = 7,090 (IF₅ = 7,176), MNiSW = 140 pkt
2. Trzebny A., Mizera J., Dabert M. *Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species*. Under review in Scientific Reports.
DOI: 10.21203/rs.3.rs-1579811/v1
Q1 (WoS), 93% (SCOPUS), IF = 4,476 (IF₅ = 5,134), MNiSW = 140 pkt
3. Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Bjorkroth K., Dabert M. (2021) *Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content*. Microbial Ecology.
DOI: 10.1007/s00248-021-01944-z
Q1 (WoS), 93% (SCOPUS), IF = 4,552 (IF₅ = 4,770), MNiSW = 100 pkt

4. Trzebny A., Liberska J., Słodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. (2022)

Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (Ixodes ricinus). Parasites & Vectors 15 (26).

DOI: 10.1186/s13071-022-05150-9

Q1 (WoS), 82% (SCOPUS), IF = 3,876 (IF₅ = 3,959), MNiSW = 100 pkt

AUTOREFERAT

Mikrosporydia (Microsporidia) to grupa obligatoryjnych, wewnątrzkomórkowych eukariotycznych pasożytów, które mogą infekować szerokie spektrum gospodarzy, w tym inne pasożyty (Han i Weiss, 2017; Murareanu i in., 2021; Stentiford i in., 2016). Typ Microsporidia dzieli się na trzy główne linie ewolucyjne: monofiletyczne, tak zwane „klasyczne Microsporidia” oraz słabo zbadane Metchnikovellida i Chytridiopsida (Bass i in., 2018; Corsaro i in., 2019). Analizy filogenetyczne „klasycznych mikrosporydiów” oparte o sekwencje genu rRNA małej podjednostki rybosomu (ssu rDNA) wykazały, że organizmy te grupują się w trzy główne kłady nazwane Aquasporidia, Terresporidia oraz Marinosporidia. Nazwy kładów związane są z siedliskiem, w którym występuje większość gospodarzy mikrosporydiów (Dubuffet i in., 2021). Jednakże od 29% do 44% gatunków mikrosporydiów zgrupowanych w poszczególnych kładach infekuje gospodarzy z innego siedliska (Murareanu i in., 2021).

Najczęstszym sposobem rozprzestrzeniania się mikrosporydiów jest bezpośrednia transmisja horyzontalna przez pokarm lub środowisko, do którego dostają się wraz z odchodami lub po śmierci zarażonego żywiciela (Didier i Weiss, 2011). Ponadto, niektóre rodzaje mikrosporydiów (np. *Duboscqia*, *Hyalinocysta* i *Parathelohania*) charakteryzują się pośrednią transmisją horyzontalną, gdzie żywicielem pośrednim jest widłonóg. Inne gatunki (np. należące do rodzajów *Culicospira*, *Edhazardia* i *Nosema*) rozprzestrzeniają się wertykalnie, infekując jajniki i jajowody samic. Mikrosporydia, podobnie jak wiele innych pasożytów oportunistycznych, cechują się specyficznym gatunkowo i zależnym od kondycji żywiciela przebiegiem infekcji gospodarza (Cali i Takvorian, 2014; Solter, 2014).

Mikrosporydia charakteryzują się wysoką adaptacją do pasożytnictwa: zawierają silnie zredukowane mitochondria (mitosomy), nie mają aparatu Golgiego, peroksysomów, ani innych prostych organelli tego typu, a ich rybosomy mają strukturę podobną

do bakteryjnych 70S (Vávra i Lukeš, 2013). Ponadto, genomy mikrosporydiów są silnie zredukowane (od 2,3 do 51,3 Mbp), a ich struktura zbliżona jest do struktury genomów bakterii (Akiyoshi i in., 2009). Jedynym stadium rozwojowym zdolnym do przeżycia poza komórką gospodarza są spory, które wyposażone są w charakterystyczny aparat infekcyjny, utworzony z unikalnego zestawu organelli, w tym nici polarnej, która umożliwia iniekcję sporoplazmy wraz z zawartością do komórki gospodarza (Franzen, 2008; Keeling i in., 2010; Vávra i Larsson, 2014). Liczba zwojów nici polarnej, jak również jej kąt zagięcia są jednymi z głównych cech ultrastrukturalnych wykorzystywanych do identyfikacji gatunkowej mikrosporydiów. Gatunki patogenne dla człowieka charakteryzują się sporami niewielkich rozmiarów, stąd ich rutynowa identyfikacja w oparciu o metody ultrastrukturalne jest utrudniona (Weiss, 2020).

Dotychczas wykazano, że 17 gatunków mikrosporydiów należących do ośmiu rodzajów i jednego „zbiórczego rodzaju” *Microsporidium*, wywołuje szereg objawów klinicznych (Han i in., 2021). Gatunki te mogą infekować każdy organ, a zapalenie mózgu, mięśni, oczu oraz zatok są najczęściej notowanymi zespołami schorzeń (Didier i Weiss, 2011). Do czasu globalnej pandemii AIDS mikrosporydioza była stosunkowo rzadko rozpoznawana u ludzi. Obecnie wiadomo, że w przypadku dużych ognisk, choroba ta może wystąpić zarówno u osób immunokompetentnych, jak i z niedoborem odporności (Nkinin i in., 2007; Didier i Weiss, 2011).

„Klasyczne mikrosporydia” stanowią największą grupę w typie *Microsporidia*, obejmującą ponad 1700 gatunków należących do 220 rodzajów (Han i in., 2021). Większość z nich infekuje bezkręgowce, w tym stawonogi, spośród których ponad 1000 gatunków jest gospodarzami tych obligatoryjnych pasożytów (Murareanu i in., 2021). Spory mikrosporydiów stwierdzono na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy, w tym w siedliskach słodkowodnych, słonowodnych, morskich i lądowych, (Han i in., 2021). Niemniej jednak, większość doniesień dotyczących mikrosporydiów pochodzi z terenów Europy i Ameryki Północnej, co sugeruje niedostateczne poznanie

różnorodności gatunkowej tych pasożytów na całym świecie (Murareanu i in., 2021). Co więcej, nawet w przypadku znanych, patogennych dla człowieka gatunków, lekarze wciąż mają duże trudności z rozpoznaniem lub wykluczeniem mikrosporydiozy u pacjentów z przewlekłymi chorobami zapalnymi.

Niedostatecznie poznana jest również ekologia mikrosporydiów. Przeważnie uważa się je za pasożyty monokseniczne. Niewiele jest danych dotyczących mikrosporydiów występujących w koinfekcjach, jak również na temat ich interakcji z innymi pasożytami (Bano, 1958; Bargielowski i Koella, 2009; Natsopoulou i in., 2015; Pilarska i in., 2006; Solter i Becnel, 2003; Tounou i in., 2008). Dotychczas badania dotyczące oddziaływań między mikrosporydiami, a innymi patogenami koncentrowały się głównie na możliwym hamowaniu przez mikrosporydia rozwoju *Plasmodium* spp. w komarach (Bano, 1958; Bargielowski i Koella, 2009). Żadne z wcześniejszych badań nie dotyczyło interakcji pomiędzy mikrosporydiami koinfekującymi komary.

Niedostateczne poznanie różnorodności i ekologii mikrosporydiów częściowo spowodowane jest brakiem wysokowydajnych metod do szybkiej i czułej detekcji tych pasożytów. Stąd, celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie wysokoprzepustowej metody przydatnej do wykrywania mikrosporydiów w oparciu o uniwersalny marker DNA. Hematofagi są narażone na kontakt z mikrosporydiami pochodzącymi ze środowiska oraz z (potencjalnie) zakażonych kręgowców, na których żerują. Stąd, jako model wykorzystałem komary (Culicidae) oraz kleszcze (Ixodidae), gdyż stawonogi te są najważniejszymi wektorami patogenów kręgowców. Opracowaną metodę zastosowałem, aby odpowiedzieć na następujące pytania: (1) jaka jest faktyczna różnorodność gatunkowa mikrosporydiów u tych gospodarzy; (2) czy mikrosporydia infekujące tego samego gospodarza oddziałują ze sobą; oraz (3) czy zakażenie mikrosporydiami wpływa na mikrobiom gospodarza. Znalezienie odpowiedzi na te pytania tworzy nowe możliwości badań w obszarze ekologii pasożytów oraz może mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej.

W pierwszej części mojej pracy doktorskiej opracowałem szybką i czułą metodę wykrywania DNA mikrosporydiów (Trzebny i in., 2020). Metoda ta opiera się o sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) hiperzmiennego regionu V5 ssu rDNA mikrosporydiów oraz skróconego fragmentu standardowego barkodu DNA dla zwierząt (gospodarzy), tj. genu podjednostki I oksydazy cytochromu c (COI). Zaprojektowany zestaw starterów CM-V5F/CM-V5R umożliwia amplifikację ssu rDNA mikrosporydiów ze wszystkich głównych linii ewolucyjnych klasycznych mikrosporydiów. Metoda ta jest powtarzalna i pozwala na wykrycie 100 spor w jednym mililitrze. Czułość ta jest porównywalna z innymi metodami ilościowymi opartymi o PCR (Menotti i in., 2003; Wolk i in., 2002) i mikromacierzami opracowanymi do detekcji *Encephalitozoon* spp. w próbach klinicznych (Wang i in., 2005).

Walidację nowej metody przeprowadziłem na podstawie: (1) komercyjnych linii spor *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, i *E. intestinalis*; (2) izolatów DNA *Anncaliia algerae*, *Enterocytozoon bieneusi* i *Vavraia culicis*; (3) komarów *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Culex quinquefasciatus* i *Uranotaenia lowii*, które zostały wychodowane w warunkach laboratoryjnych, co gwarantowało brak infekcji mikrosporydiami; oraz (4) około 200 samic komarów zebranych w warunkach terenowych. Wyhodowane komary oraz izolaty DNA *A. algerae* i *V. culicis* otrzymałem od Jamesa J. Becnela oraz Neila Sanscrainte z USDA Agricultural Research Service, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, Gainesville, FL, USA w ramach współpracy nawiązanej przeze mnie na początku studiów doktoranckich podczas 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology w 2018 roku.

Porównanie opracowanej przeze mnie metody ze standardową metodą opartą o PCR i sekwencjonowanie sangerowskie wykazało, że metabarkoding DNA jest skuteczniejszy w wykrywaniu DNA mikrosporydiów, ponieważ metabarkoding jest czulszy i umożliwia wykrycie różnych gatunków mikrosporydiów współwystępujących u tego samego gospodarza. Wyniki uzyskane dla komarów zebranych w terenie zasugerowały,

że (1) osobniki komarów w populacjach naturalnych mogą być zainfekowane więcej niż jednym gatunkiem mikrosporydium; (2) mikrosporydia w koinfekcjach prawdopodobnie oddziałują na siebie; (3) ten sam gatunek mikrosporydium może infekować kilka różnych gatunków żywicieli.

W drugiej części mojej pracy doktorskiej, przeanalizowałem prewalencję i różnorodność mikrosporydii na dużej próbie komarów europejskich, aby zweryfikować moje wstępne obserwacje dotyczące gatunków potencjalnie poliksenicznych i wzajemnych oddziaływań mikrosporydii występujących w koinfekcjach (Trzebny et al., 2022b). W wyniku analizy próby obejmującej samce i samice ponad 2000 osobników zebranych na przełomie trzech lat, zidentyfikowałem te same dominujące gatunki komarów, co w poprzednim badaniu (Trzebny i in., 2020), ale zebrałem również *Anopheles messeae*, *Cx. pipiens*, *Cx. territans* oraz *Och. communis*. *Anopheles messeae* nie występował licznie, jednakże jego obecność jest warta uwagi, ponieważ jest on jednym z wektorów malarii w Europie. Co prawda obecnie gatunek ten nie jest uznawany za zagrożenie w Polsce (Hertig, 2019; Piperaki i Daikos, 2016; Sinka i in., 2010), jednakże jego obecność wskazuje na potencjalne ryzyko, zwłaszcza, że modelowania występowania wektorów malarii sugerują rozprzestrzenianie się tego gatunku w kierunku północnym (Hertig, 2019).

Ogółem, wśród dziesięciu gatunków komarów zidentyfikowałem zarówno mikrosporydia wcześniej obserwowane u tych owadów (*Amblyospora salinaria*, *A. stimuli*, *Amblyospora* sp. 2, *Hazardia* sp.), jak również co najmniej jedenaście gatunków dotychczas nie zidentyfikowanych u tych żywicieli: *Amblyospora* sp. 1, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozpora artemiae*, *Nosema adaliae*, *N. ceranae*, *N. pieriae*, *N. thomsoni*, *Nosema* sp. CHW-2007a, *N. chrysorrhoeae* i/lub *N. portugal*, *Microsporidium* sp. BLAT1 oraz, w oparciu o sekwencję genu ssu rDNA, nowy gatunek mikrosporydium, który nazwałem *Microsporidium* sp. PL01 (Trzebny i in., 2022b, 2020). W obu badaniach

Microsporidium sp. PL01 był dominującym gatunkiem, który zidentyfikowałem we wszystkich analizowanych gatunkach żywicieli.

Dotychczas wśród specjalistów zajmujących się mikrosporydiami panował pogląd, że ponad 80% gatunków mikrosporydii infekujących bezkręgowce, w tym komary, to pasożyty monokseniczne, tj. infekujące jeden gatunek żywiciela, a jedynie 10% to pasożyty polikseniczne (Murareanu i in., 2021). W moich badaniach wszystkie wykryte mikrosporydia występowały u co najmniej trzech gatunków komarów, co wskazuje, że mikrosporydia infekujące komary są pasożytami poliksenicznymi, a nie monoksenicznymi.

W artykule dotyczącym mikrosporydii infekujących komary w Europie Środkowej wykazałem, że nawet jedna trzecia osobników dorosłych może być zarażona mikrosporydiami (Trzebny i in., 2022b). Chociaż jest to wysoki odsetek, to moja wcześniejsza analiza na osobnikach odłowionych w lipcu i sierpniu 2016 roku wykazała, że wartość ta może sięgać nawet około 60% (Trzebny i in., 2020). Różnica ta prawdopodobnie wynika z silnej korelacji pomiędzy infekcją mikrosporydiami, a średnimi temperaturami. W pierwszym badaniu komary były zbierane w najcieplejszych miesiącach w Polsce, natomiast drugie obejmowało trzy sezony od czerwca do września, gdzie wahania temperatury sięgały 20°C (od 10°C do 30°C) (dane niepublikowane).

W moich badaniach, odsetek osobników, u których występowały co najmniej dwa gatunki mikrosporydii wynosił między 3,6% (Trzebny i in., 2022b), a 9,4% (Trzebny i in., 2020). Prawdopodobnie różnica ta, podobnie jak w przypadku prewalencji, wynika z zależności pomiędzy infekcjami mikrosporydiami, a temperaturą. Pomimo rzadziej notowanych koinfekcji w drugim badaniu, w obu przypadkach występowała pozytywna korelacja wyrażona w rosnącej liczbie odczytów sekwencji reprezentujących *A. salinaria* i *Amblyospora* sp. 1 (identyczna z AY090055) (Trzebny i in., 2022b, 2020). W badaniu obejmującym większą liczbę osobników (Trzebny i in., 2022b), zaobserwowałem również dodatnie korelacje pomiędzy (1) *N. ceranae* i *Hazardia* sp.; (2) *N. ceranae*

i *Microsporidium* sp. BLAT1; oraz (3) *Microsporidium* sp. BLAT1 i *Amblyospora* sp.1. W nielicznych przypadkach odnotowałem, że współwystępowanie niektórych mikrosporydiów prowadzi do obniżenia liczby odczytów sekwencji reprezentujących oba gatunki. Zamierzam kontynuować te badania, ponieważ zaobserwowane interakcje mogą mieć istotny wpływ na inne patogeny przenoszone przez komary, a tym samym mogą być przydatne w opracowywaniu strategii zwalczania takich pasożytów, jak np. zarodźce malaryczne (Herren i in., 2020).

W trzeciej części mojej rozprawy doktorskiej wykryłem zmiany w mikrobiocie jelitowej komarów związane z zarażeniem mikrosporydiami (Trzebny i in., 2021). Mikrobiom jest jednym z głównych czynników wpływających na pasożyty jelitowe; zmiany w jego składzie gatunkowym, prowadzące do produkcji określonych metabolitów mogą wpływać na przeżywalność pasożytów (Engel i Moran, 2013; Romoli i Gendrin, 2018). Choć owady są powszechnymi żywicielami mikrosporydiów (Murareanu i in., 2021), dane dotyczące ich wpływu na mikrobiotę są nieliczne, np. wykazano, że obecność *N. ceranae* jest częściowo skorelowana ze zmianami w strukturze mikrobiomu oraz silnie skorelowana z niektórymi gatunkami bakterii (np. *Gilliamella* spp. u pszczoły miodnej, *Apis mellifera*) (Rubanov i in., 2019). Do czasu mojego doktoratu nie przeprowadzono badań nad możliwym wpływem mikrosporydiów na mikrobiom komarów.

W badaniu mikrobioty wykorzystałem izolaty DNA pochodzące od samic komarów odłowionych w 2016 roku (Trzebny i in. 2020), które reprezentowały pięć gatunków: *Ae. vexans*, *Cq. richiardii*, *Och. annulipes*, *Och. cantans* i *Och. sticticus*. Wśród nich ponad połowa była gospodarzami mikrosporydiów. Wykazałem, że niektóre gatunki bakterii wchodzące w skład mikrobioty komarów są związane z zakażeniem wywołanym przez mikrosporydia. Zidentyfikowałem zależność pomiędzy obecnością DNA mikrosporydiów, a bakteriami należącymi do *Spiroplasmataceae* i *Leuconostocaceae*, reprezentowanymi przez pojedyncze gatunki, odpowiednio *Spiroplasma* sp. PL03 i *Weissella* cf. *viridescens*.

Ponadto osobniki zainfekowane mikrosporydiami były wyłącznymi gospodarzami *W. cf. viridescens*.

Wykazałem również, że w porównaniu z mikrobiotą komarów niezakażonych, mikrobiota komarów zakażonych mikrosporydiami charakteryzowała się zdolnością biosyntezy antybiotyków z grup ansamycyn i wankomycyny oraz wyższą aktywnością szlaku pentozofosforanowego. Otrzymane przeze mnie rezultaty dostarczają dowodów na hipotezę, że mikrosporydia mogą wpływać na szlaki metaboliczne mikrobiomu gospodarza w celu promowania syntezy nukleotydów, a tym samym zwiększania potencjału do importu ATP oraz nukleotydów (He i in., 2020).

W czwartej części mojej rozprawy doktorskiej, określiłem występowanie mikrosporydiów w kleszczach, również w celu poznania roli kleszczy, jako potencjalnych wektorów zoonotycznych gatunków mikrosporydiów (Trzebny i in., 2022a). Zdziwiająco wiedza na temat infekcji mikrosporydiami u kleszczy jest bardzo skąpa. Do czasu mojego doktoratu odnotowano w kleszczach tylko pięć gatunków: *Encephalitozoon-like*, *Nosema parkei*, *N. slovaca*, *Nosema-like* i *Unikaryon (Nosema) ixodis* (patrz: Tabela 1 w Trzebny i in., 2022a). Wszystkie z nich zostały wykryte przy użyciu technik mikroskopowych, a dla żadnego z nich nie jest znana sekwencja DNA. Dla porównania, u komarów stwierdzono występowanie ponad 250 gatunków mikrosporydiów (patrz: Tabela 1 w Trzebny i in., 2022b).

Na obecność mikrosporydiów przebadalem ponad 1100 izolatów DNA z kleszczy, które wszystkie okazały się należeć do gatunku *Ixodes ricinus*. Materiał ten obejmował 1070 kleszczy żerujących i 94 napite krwią samice, które zostały zebrane ze zwierząt domowych. Moje wyniki wykazały, że *I. ricinus*, główny wektor chorób odzwierzęcych w Europie, najprawdopodobniej nie bierze udziału w przenoszeniu zoonotycznych gatunków mikrosporydiów, ponieważ żaden z żerujących kleszczy nie był gospodarzem mikrosporydiów patogennych dla kręgowców, w tym dla człowieka.

Chorobotwórczy *E. intestinalis* stwierdziłem u trzech napitych samic (3,2%), które zostały zebrane z psów. Ze względu na liczne doniesienia o występowaniu *E. intestinalis* u psów (Duzlu i in., 2019; Piekarska i in., 2017, 2016), jak i wcześniejsze badania sugerujące, że źródłem infekcji *Encephalitozoon-like* u kleszczy z rodzajów *Amblyomma* i *Anocentor* może być pobrana przez nie krew gospodarzy (Ribeiro i Guimarães, 1998; Ribeiro i Passos, 2006), przypuszczam, że obecność *E. intestinalis* u samic *I. ricinus* wynikała z ich wcześniejszego żerowania na psach zainfekowanych tym gatunkiem mikrosporydium.

Wśród kleszczy żerujących, zidentyfikowałem jeden gatunek mikrosporydium należący do rodzaju *Endoreticulatus*, którego prevalencja wynosiła poniżej 0,8%. Tak niski odsetek sugeruje, że kleszcze wykształciły mechanizmy obronne przed zarażeniem przez mikrosporydia. Niektóre z tych mechanizmów zostały zaproponowane we wcześniejszych badaniach (Sokolova i in., 2000; Tokarev i in., 2007). Uzyskana przeze mnie sekwencja ssu rDNA *Endoreticulatus* sp. PL02 jest pierwszą sekwencją mikrosporydiów znalezioną w kleszczach, dlatego porównanie jej z *N. slovaca*, *Unikaryon* (*Nosema*) *ixodis* i/lub *Nosema-like* stwierdzonymi wcześniej u *I. ricinus* było niemożliwe. Ze względu na znikomą prevalencję mikrosporydiów u *I. ricinus* nie przeprowadziłem badań dotyczących ich wpływu na mikrobiom, ponieważ wyniki byłyby mało wiarygodne.

Podsumowując, w mojej pracy doktorskiej opracowałem szybką i czułą metodę wykrywania DNA mikrosporydiów. Metoda ta może być stosowana zarówno do identyfikacji różnorodności gatunkowej mikrosporydiów na poziomie spor, jak i do wykrywania zakażeń mikrosporydiami w dowolnym rodzaju badanych prób biologicznych. Moje dane wskazują, że hematofagiczne stawonogi, takie jak komary i kleszcze, mogą znacznie różnić się pod względem częstości występowania oraz liczby gatunków mikrosporydiów, których są żywicielami. Wykazałem również, że mikrosporydia współzakażające tego samego żywiciela mogą oddziaływać na siebie. Zależność

tą odzwierciedlał wzajemny wzrost lub spadek liczby odczytów sekwencji reprezentujących poszczególne gatunki mikrosporydiów. Ponadto, obecność mikrosporydiów zmienia skład mikrobiomu jelitowego, który charakteryzuje się występowaniem gatunków bakterii zdolnych do pełnienia specyficznych funkcji metabolicznych. Opracowana przez mnie metoda metabarkodingu DNA mikrosporydiów i ich gospodarzy oraz wyniki mojej pracy doktorskiej stwarzają nowe możliwości w badaniach nad ekologią pasożytów. W przyszłości metoda ta może być rozwinięta o identyfikację innych mikropasożytów jelitowych, a tym samym może być wykorzystana do określenia specyficznych biomarkerów mikrobiologicznych, świadczących o zakażeniach różnymi mikropasożytami.

THESIS OUTLINE

Microsporidians (Microsporidia) are a group of obligate, intracellular eukaryotic parasites that can infect a wide range of hosts, including other parasites (Han and Weiss, 2017; Murareanu et al., 2021; Stentiford et al., 2016). The phylum Microsporidia consists of three evolutionary lineages: the so-called "classical Microsporidia" and two poorly studied groups, the Metchnikovellida and the Chytridiopsida (Bass et al., 2018; Corsaro et al., 2019). Phylogenetic analyses of classical Microsporidia based on the small subunit rRNA gene (ssu rDNA) sequences have shown that they group into three main clades, Aquasporidia, Terresporidia, and Marinosporidia, related with the most common host environmental habitat (Dubuffet et al., 2021). However, although among each of the clades, there is a predominant habitat, there are still 29 to 44% of microsporidian species in each clade infecting a host from a different habitat (Murareanu et al., 2021).

The most common way in which microsporidians spread is the horizontal transmission of infectious spores via food or the environment to animal or protist host (Didier and Weiss, 2011). Infectious spores are released into the environment with excreted faeces or when the infected host dies. However, horizontal transmission in some microsporidian genera (e.g., *Duboscqia*, *Hyalinocysta*, and *Parathelohania*) requires obligatory development in an intermediate copepod host to efficiently infect a definitive host. Microsporidians that use vertical transmission (e.g., *Culicospora*, *Edhazardia*, and *Nosema*) usually infect ovaries and associated reproductive structures of the host. Similarly to other opportunistic parasites, the pattern of microsporidian infestation is highly variable and strongly dependent on both host condition and the infecting microsporidian species (Cali and Takvorian, 2014; Solter, 2014).

Microsporidians are a perfect example of the organisms with reduction of cellular functions in adaptation to extreme parasitism: they contain significantly reduced mitochondria (mitosomes), have neither Golgi apparatus nor peroxisomes and other

simple organelles of this type, and their ribosomes have similar structure to the bacterial 70S (Vávra and Lukeš, 2013). Also, microsporidian genomes are strongly reduced (2.3 to 51.3 Mbp) and, to some extent, their organization resembles those of bacteria (Akiyoshi et al., 2009). Microsporidian spores – the only developmental stage with the ability to survive outside the host cell – are equipped with a characteristic infection apparatus, built from a unique set of organelles, including a polar filament, which allows for the injection of infective sporoplasm into the host cell (Franzen, 2008; Keeling et al., 2010; Vávra and Larsson, 2014). The number of the polar filament coils and its internal organization are one of the major ultrastructural characters used in microsporidian species identification. Human pathogenic species are characterised by small spores, therefore their routine identification based on ultrastructural methods is difficult (Weiss, 2020).

To date 17 microsporidian species belonging to eight genera and one holding genus *Microsporidium* were found to cause a wide range of clinical human diseases (Han et al., 2021). These species can infect any organ system and the most common reports relate to infection encephalitis, myositis, ocular infection and sinusitis (Didier and Weiss, 2011). Until the AIDS pandemic microsporidiosis was relatively rarely recognized in humans. However, in both immuno-competent and immune-deficient groups of people the prevalence of microsporidian infections in case of large infection outbreaks can reach large numbers (Nkinin et al., 2007; Didier & Weiss, 2011).

Classical Microsporidia are the largest group in the phylum, with more than 1,700 described species belonging to 220 genera (Han et al., 2021). The majority of the species infect invertebrates, including arthropods of which more than 1,000 species have been documented as microsporidian hosts (Murareanu et al., 2021). All in all, microsporidian spores have been found all over the world, including freshwater, brackish, marine, and terrestrial habitats from all continents except Antarctica (Han et al., 2021). On the one hand, most of the microsporidian species were described from Europe and North America, which implies a possible poor recognition of the species diversity of microsporidians

worldwide. On the other hand, even in the case of the known species, physicians face great difficulty in diagnosing or excluding microsporidiosis in patients with chronic atypical inflammatory diseases.

The ecology of microsporidians is also poorly understood. In general, the prevailing opinion is that they are rather monoxenous parasites. There are only few reports on microsporidians in co-infections and their interactions with other parasites (Bano, 1958; Bargielowski and Koella, 2009; Natsopoulou et al., 2015; Pilarska et al., 2006; Solter and Becnel, 2003; Tounou et al., 2008). These studies have mainly focused on the possible influence of microsporidians on the development of *Plasmodium* parasites in mosquitoes (Bano, 1958; Bargielowski and Koella, 2009). None of them concerned interactions between microsporidians co-occurring in the same host individual.

The relatively poor recognition of microsporidian diversity and ecology is also partly due to the lack of high-throughput methods for fast and efficient detection of microsporidian species. Therefore, the aim of my PhD thesis was to develop a new molecular method for the rapid and sensitive detection of microsporidian presence using an universal DNA marker. I decided to focus on hosts depending on blood meal, because they are exposed to microsporidians from the environment and (potentially) infected vertebrates on which they feed. I chose mosquitoes (Culicidae) and ixodid ticks (Ixodidae) as these groups include the most important disease vectors. I used this approach to answer the following questions: (1) What is the actual microsporidian species diversity in these hosts; (2) Do the microsporidians co-occurred in the same host individual interact?; (3) Does the infection with microsporidians affect the host microbiome? Because by finding such changes, one would provide a basis for identification of microbial biomarkers of microsporidian infection.

In the first part of my PhD thesis, I have developed a fast and sensitive method to the detection of microsporidian DNA in all types of DNA samples (Trzebny et al., 2020). The method is based on NGS sequencing of a new marker covering the

hypervariable V5 region of ssu rDNA and the shortened fragment of the standard metazoan DNA-barcode, i.e., the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, for microsporidian and host species identification, respectively. The designed CM-V5F/CM-V5R primer set enables amplification of ssu rDNA in all classical microsporidian evolutionary lineages of classical Microsporidia. The method has proved to be reproducible and allows to detect 100 spores per 1 ml, which is comparable with other PCR-based methods (Menotti et al., 2003; Wolk et al., 2002) or microarray techniques developed for *Encephalitozoon* spp. in clinical samples (Wang et al., 2005).

I validated the new method based on (1) commercial lines of microsporidian spores: *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, and *E. intestinalis*; (2) DNA isolates of *Anncaliia algerae*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Vavraia culicis*; (3) cultures of microsporidian-negative *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Culex quinquefasciatus* and *Uranotaenia lowii*; and (4) about 200 field-collected mosquito females. The cultured mosquitoes and DNA isolates of *A. algerae* and *V. vulicis* were made available to me by James J. Becnel and Neil Sanscrainte from USDA Agricultural Research Service, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, Gainesville, FL, USA, as a result of cooperation established at the beginning of my PhD studies, during 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology in 2018.

The comparison of this method with a standard PCR-based and Sanger sequencing approach clearly showed that the DNA-metabarcoding is more accurate for detecting microsporidian DNA and allows to detect different microsporidian species co-occurring in the same host individual. Moreover, the results obtained for field-collected mosquitoes suggested that (1) mosquito individuals in natural populations may host more than one species of microsporidians; (2) during co-infection microsporidians probably influence each other; and (3) the same microsporidian species can infect multiple hosts.

In the second part of my PhD thesis, I examined the prevalence and diversity of microsporidian species across a large sample of European mosquitoes to verify

my preliminary observations concerning potentially polyxenous species and the effects of co-occurring species on each other (Trzebny et al., 2022b). As a result of the analysis over 2,000 individuals, including female and male collected over three years, I found the same dominant mosquito species as in the previous study (Trzebny et al., 2020), but additionally I collected and analysed *Anopheles messeae*, *Cx. pipiens*, *Cx. territans*, and *Och. communis*. Although *An. messeae* was sampled in small numbers, its presence is noteworthy, because it is considered as one of the malaria vector in Europe. *Anopheles messeae* currently is not considered a threat in Poland (Hertig, 2019; Piperaki and Daikos, 2016; Sinka et al., 2010); however, its presence indicates a potential risk, especially that modelled probabilities of its occurrence indicate the northward spread of this species (Hertig, 2019).

Overall, among ten mosquito species I have identified microsporidians previously observed in these insects (*Amblyospora salinaria*, *A. stimuli*, *Amblyospora* sp. 2, *Hazardia* sp.) as well as at least eleven species so far not identified in these hosts: *Amblyospora* sp. 1, *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozpora artemiae*, *Nosema adaliae*, *N. ceranae*, *N. pieriae*, *N. thomsoni*, *Nosema* sp. CHW-2007a, *N. chrysorrhoeae* and/or *N. portugal*, *Microsporidium* sp. BLAT1, and a new microsporidian ssu rDNA gene sequence which I named *Microsporidium* sp. PL01 (Trzebny et al., 2022b, 2020). In both studies *Microsporidium* sp. PL01 was the predominant microsporidian species that infected all analysed host species.

To date, there was a well-established consensus among microsporidian specialists that more than 80% of microsporidian species infecting invertebrates, including mosquitoes, are monoxenic, i.e., use one host species, and only about 10% has been identified as polyxenic parasites (Murareanu et al., 2021). In my studies, all detected microsporidians were found in at least three mosquito species, which means that these microsporidians are polyxenic parasites rather than monoxenic ones.

In the article concerning microsporidians parasitic on mosquitoes in central Europe I showed that up to one-third of adult mosquitoes may be infected with microsporidians (Trzebny et al., 2022b). Although this is a high ratio, my previous analysis based on mosquitoes collected in July and August 2016 showed that about 60% of mosquitoes were microsporidian-positive (Trzebny et al., 2020). This difference is probably due to the strong correlation between microsporidian infections and mean air temperatures. The first study mosquitoes were collected from warmest months in Poland, while second includes three seasons from June to September (temperature fluctuations from 10°C to 30°C) (unpublished data).

My data show that the co-occurrence of DNAs representing different microsporidian species in mosquitoes amount from 3.6% (Trzebny et al. 2022b) to 9.4% (Trzebny et al. 2020). The difference among two studied groups probably due to the same fact as microsporidian prevalence - the relationship between microsporidian infections and temperatures. Despite the lower frequency of co-occurrences in the second study, in both cases I noticed a positive correlation in the increasing number of sequence reads representing *A. salinaria* and *Amblyospora* sp. 1 (identical to AY090055) (Trzebny et al., 2022b, 2020). In a study considering a larger sample of individuals (Trzebny et al., 2022b), I also noted positive correlations between *N. ceranae* and *Hazardia* sp., *N. ceranae* and *Microsporidium* sp. BLAT1, and *Microsporidium* sp. BLAT1 and *Amblyospora* sp.1. In rare cases, I noted that the co-occurrence of some microsporidians leads to decreasing numbers of sequence reads of both species. I intend to continue these studies, because the observed interactions can influence other mosquito-borne pathogens and thus can be useful in the development of control strategies for e.g. malaria parasites (Herren et al., 2020).

In the third part of my PhD thesis, I detected changes in mosquito gut microbiota associated with microsporidian infection (Trzebny et al., 2021). The intestinal microbiome is one of the main factors affecting intestinal parasites; changes

in its species composition leading to the production of different metabolites may impair parasite survival (Engel and Moran, 2013; Romoli and Gendrin, 2018). Although insects are common hosts of microsporidians (Murareanu et al., 2021), data about the impact of the parasites on host microbiota are sparse, e.g. it had been shown that *Nosema ceranae* is, to some extent, associated with changes in gut microbiome structure and its presence is strongly correlated with some gut microbiome members (e.g. *Gilliamella* spp. in the honey bee, *Apis mellifera*) (Rubanov et al., 2019), while there were no data concerning the possible effects of microsporidian infection on the mosquito microbiome.

To examine microbiota, I used DNA isolates from female mosquitoes representing five species: *Ae. vexans*, *Cq. richiardii*, *Och. annulipes*, *Och. cantans* and *Och. sticticus* collected in 2016 (Trzebny et al. 2020). Among them, 58% were positive for microsporidian DNA. I determined that the mosquito gut microbiome members are associated with intestinal infection by microsporidians. I found a correlation between the presence of microsporidian DNA and bacteria belonging to *Spiroplasmataceae* and *Leuconostocaceae*, both represented by single species, *Spiroplasma* sp. PL03 and *Weissella* cf. *viridescens*, respectively. Also, I revealed that mosquitoes infected with microsporidians were characterised by the exclusive occurrence of the *W.* cf. *viridescens*.

Moreover I have shown that the microbiota of mosquitoes infected with microsporidians were characterised by the ability of biosynthesis of ansamycins and antibiotics belonging to the vancomycin group as well as higher activity of the pentose phosphate pathway, when compared to the non-infected mosquitoes. These results support the hypothesis that microsporidians can manipulate biological processes in the host microbiome to promote nucleotide synthesis and, in this way, increase the potential for ATP and nucleotide import (He et al., 2020).

In the fourth part of my PhD thesis, I studied microsporidian occurrence in hard ticks, also to assess the role of ticks as potential vectors of microsporidian species causing diseases in humans (Trzebny et al., 2022a). Astonishingly, the

knowledge about microsporidian infections in ticks was sparse. Until my PhD, five microsporidian species, including *Encephalitozoon*-like, *Nosema parkei*, *N. slovaca*, *Nosema*-like, and *Unikaryon (Nosema) ixodis* have been found in ticks (Trzebny et al., 2022a). All of them were found using microscopic techniques, and none of the species were known from DNA sequence. In contrast, more than 250 microsporidian species were found in mosquitoes (see Table 1 in Trzebny et al., 2022b).

More than 1,100 *Ixodes ricinus* DNA isolates, including 1,070 host-seeking ticks and 94 engorged tick females removed from pet animals were screened for microsporidian DNA. My results showed that *I. ricinus*, the major vector of causative agents of zoonotic diseases in Europe most probably is not involved in transmission of zoonotic microsporidian species, because none of the analyzed host-seeking ticks was positive for any human pathogenic species.

The human pathogenic *E. intestinalis* was found only in three fed females (3.2%) removed from dogs. Due to both numerous reports about the occurrence of *E. intestinalis* in dogs (Duzlu et al., 2019; Piekarska et al., 2017, 2016) and previous studies suggested that blood meals are the source of *Encephalitozoon*-like infection of *Amblyomma* and *Anocentor* ticks (Ribeiro and Guimarães, 1998; Ribeiro and Passos, 2006), I expect that the presence of *E. intestinalis* in engorged *I. ricinus* females resulted from their earlier feeding on dogs with microsporidiosis.

Surprisingly, among unfed host-seeking ticks only one microsporidian species belonging to the *Endoreticulatus* genus, was found with a very low prevalence (0.75%; 8/1,070). This very low occurrence of the microsporidian DNA in both fed and host-seeking ticks implies that some mechanisms exist to defend ticks against infection with these parasites. Some of the mechanisms that may underlie this immunity were proposed earlier (Sokolova et al., 2000; Tokarev et al., 2007). The *Endoreticulatus* sp. PL02 ssu rDNA is the first microsporidian sequence obtained from ticks, therefore the comparison with *N. slovaca*, *Unikaryon (Nosema) ixodis* and/or *Nosema*-like previously noticed in *I. ricinus*

is unfortunately unfeasible. Due to the negligible distribution of microsporidians in *I. ricinus* I have not studied their influence on host microbiome, because the results would be unreliable.

Summarizing, in my PhD thesis I have developed a fast and sensitive method for the detection of microsporidian DNA. This method can be used for both microsporidian spore identification and to detect microsporidiosis by detecting microsporidians in any type of biological sample. My data show that hematophagous arthropods, such as mosquitoes and ticks can differ significantly in the prevalence and number of microsporidian species they host. Moreover, I found that microsporidians co-infecting the same host individual can interact with each other which was reflected by a mutual increase or decrease in the numbers of their sequence reads. In addition, the presence of microsporidians changes gut microbiome composition manifested by bacterial species capable of specific metabolic functions. My DNA-metabarcoding method for microsporidian and their hosts identification and the results of my PhD thesis provide new opportunities in studies on the ecology of parasites. In the future this method can be extended for other intestinal microparasites. Therefore, this approach can be used to identify specific microbial biomarkers for various microparasite infections.

LITERATURA

- Akiyoshi, D.E., Morrison, H.G., Lei, S., Feng, X., Zhang, Q., Corradi, N., Mayanja, H., Tumwine, J.K., Keeling, P.J., Weiss, L.M., Tzipori, S., 2009. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000261>
- Bano, L., 1958. Partial inhibitory effect of *Plistophora culicis* on the sporogonic cycle of *plasmodium cynomolgi* in *anopheles stephensi*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/181430a0>
- Bargielowski, I., Koella, J.C., 2009. A possible mechanism for the suppression of *Plasmodium berghei* development in the mosquito *Anopheles gambiae* by the Microsporidian *Vavraia culicis*. *PLoS One* 4, e4676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004676>
- Bass, D., Czech, L., Williams, B.A.P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G.D., Williams, T.A., 2018. Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *J. Eukaryot. Microbiol.* 65, 773–782. <https://doi.org/10.1111/jeu.12519>
- Cali, A., Takvorian, P.M., 2014. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia, in: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States, pp. 71–135. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch2>
- Corsaro, D., Wylezich, C., Venditti, D., Michel, R., Walochnik, J., Wegensteiner, R., 2019. Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia: Chytridiopsida). *Parasitol. Res.* 118, 169–180. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6130-1>

- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 490–5. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>
- Dubuffet, A., Chauvet, M., Moné, A., Debroas, D., Lepère, C., 2021. A phylogenetic framework to investigate the microsporidian communities through metabarcoding and its application to lake ecosystems. *Environ. Microbiol.* 23, 4344–4359. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15618>
- Duzlu, O., Yildirim, A., Onder, Z., Ciloglu, A., Yetismis, G., Inci, A., 2019. Prevalence and Genotyping of Microsporidian Parasites in Dogs in Turkey: Zoonotic Concerns. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 771–777. <https://doi.org/10.1111/jeu.12725>
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Franzen, C., 2008. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *Open Parasitol.J.* 2, 1–34. <https://doi.org/10.2174/1874421400802010001>
- Han, B., Pan, G., Weiss, L.M., 2021. Microsporidiosis in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/cmr.00010-20>
- Han, B., Weiss, L.M., 2017. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016>
- He, Q., Luo, J., Xu, J.-Z., Wang, C., Meng, X., Pan, G.-Q., Li, T., Zhou, Z.-Y., 2020. Morphology and Transcriptome Analysis of *Nosema bombycis* Sporoplasm and Insights into the Initial Infection of Microsporidia. *mSphere* 5, e00958-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00958-19>
- Herren, J.K., Mbaisi, L., Mararo, E., Makhulu, E.E., Mobegi, V.A., Butungi, H., Mancini, M.V., Oundo, J.W., Teal, E.T., Pinaud, S., Lawniczak, M.K.N., Jabara, J., Nattoh, G.,

- Sinkins, S.P., 2020. A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nat. Commun.* 11, 2187. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16121-y>
- Hertig, E., 2019. Distribution of *Anopheles* vectors and potential malaria transmission stability in Europe and the Mediterranean area under future climate change. *Parasites and Vectors* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3278-6>
- Keeling, P.J., Corradi, N., Morrison, H.G., Haag, K.L., Ebert, D., Weiss, L.M., Akiyoshi, D.E., Tzipori, S., 2010. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biol. Evol.* 2, 304–309. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq022>
- Menotti, J., Cassinat, B., Porcher, R., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J., 2003. Development of a Real-Time Polymerase-Chain-Reaction Assay for Quantitative Detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in Stool Specimens from Immunocompromised Patients with Intestinal Microsporidiosis. *J. Infect. Dis.* 187, 1469–1474. <https://doi.org/10.1086/374620>
- Murareanu, B.M., Sukhdeo, R., Qu, R., Jiang, J., Reinke, A.W., 2021. Generation of a Microsporidia Species Attribute Database and Analysis of the Extensive Ecological and Phenotypic Diversity of Microsporidia. *MBio* 12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01490-21>
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J., Paxton, R.J., 2015. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1896>
- Nkinin, S.W., Asonganyi, T., Didier, E.S., Kaneshiro, E.S., 2007. Microsporidian Infection Is Prevalent in Healthy People in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2841–2846. <https://doi.org/10.1128/JCM.00328-07>

- Piekarska, J., Kicia, M., Wesolowska, M., Kopacz, Z., Gorczykowski, M., Sobieraj, B., Kvac, M., Sak, B., 2016. Human-pathogenic microsporidia in household dogs and cats in Wroclaw (Poland). *Ann. Parasitol.* 62, 2016.
- Piekarska, J., Kicia, M., Wesolowska, M., Kopacz, Z., Gorczykowski, M., Szczepankiewicz, B., Kváč, M., Sak, B., 2017. Zoonotic microsporidia in dogs and cats in Poland. *Vet. Parasitol.* 246, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.011>
- Pilarska, D.K., Solter, L.F., Kereselidze, M., Linde, A., Hoch, G., 2006. Microsporidian infections in *Lymantria dispar* larvae: Interactions and effects of multiple species infections on pathogen horizontal transmission. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.003>
- Piperaki, E.T., Daikos, G.L., 2016. Malaria in Europe: emerging threat or minor nuisance? *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.023>
- Ribeiro, M.F.B., Guimarães, A.M., 1998. Encephalitozoon-Like Microsporidia in the Ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 35, 1029–1033. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.6.1029>
- Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., 2006. Natural co-infection of *Babesia caballi* and Encephalitozoon-like microsporidia in the tick *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *J. Invertebr. Pathol.* 93, 183–185. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.07.003>
- Romoli, O., Gendrin, M., 2018. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasites and Vectors* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2784-x>
- Rubanov, A., Russell, K.A., Rothman, J.A., Nieh, J.C., McFrederick, Q.S., 2019. Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Sci. Rep.* 9, 1–8.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40347-6>

- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M., Van Boeckel, T., Godfray, H.C.J., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors* 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-117>
- Sokolova, J.Y., Tokarev, Y.S., Lozinskaia, Y.L., Glupov, V.V., 2000. A morphofunctional analysis of the hemocytes in the cricket *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) normally and in acute microsporidiosis due to *Nosema grylli*. *Parazitologiya* 34, 408–419.
- Solter, L.F., 2014. Epizootiology of Microsporidiosis in Invertebrate Hosts, in: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. Wiley Blackwell, pp. 165–194. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch4>
- Solter, L.F., Becnel, J.J., 2003. Environmental Impacts of Microbial Insecticides, in: Hokkanen, H.M., Hajek, A. (Eds.), *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*. Springer Netherlands, pp. 93–119. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1441-9>
- Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L., 2016. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol.* 32, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>
- Tokarev, Y.S., Sokolova, Y.Y., Entzeroth, R., 2007. Microsporidia-insect host interactions: Teratoid sporogony at the sites of host tissue melanization. *J. Invertebr. Pathol.* 94, 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.006>

- Tounou, A.K., Kooyman, C., Douro-Kpindou, O.K., Poehling, H.M., 2008. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.002>
- Trzebny, A., Liberska, J., Slodkiewicz-Kowalska, A., Dabert, M., 2022a. Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). *Parasites and Vectors* 15, 26. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05150-9>
- Trzebny, A., Mizera, J., Dabert, M., 2022b. Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1579811/v1>
- Trzebny, A., Slodkiewicz-Kowalska, A., Björkroth, J., Dabert, M., 2021. Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content. *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01944-z>
- Trzebny, A., Slodkiewicz-Kowalska, A., Becnel, J.J., Sanscrainte, N., Dabert, M., 2020. A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Mol. Ecol. Resour.* 20, 1486–1504. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13205>
- Vávra, J., Larsson, J.I.R., 2014. Structure of Microsporidia, in: Weiss, L.M., Becnel, J.J. (Eds.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States, pp. 1–70. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch1>
- Vávra, J., Lukeš, J., 2013. Microsporidia and 'The Art of Living Together,' *Advances in Parasitology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6>

- Wang, Z., Orlandi, P.A., Stenger, D.A., 2005. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4121–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4121-4128.2005>
- Weiss, L.M., 2020. Microsporidiosis, in: Ryan, E.T., Hill, D.R., Solomon, T., Aronson, N.E., Endy, T.P. (Eds.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. Elsevier, pp. 825–831. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00048-X>
- Wolk, D.M., Schneider, S.K., Wengenack, N.L., Sloan, L.M., Rosenblatt, J.E., 2002. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3922–3928. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.3922-3928.2002>

PUBLIKACJA:

*A new method of metabarcoding
Microsporidia and their hosts reveals
high levels of microsporidian infections
in mosquitoes (Culicidae)*

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13205>

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). Molecular Ecology Resources 20 (6) 1486-1504.

DOI: 10.1111/1755-0998.13205

140 MNiSW points, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176)

Name of Author	Artur Trzebny
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0831-7243
Affiliation	Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
Contribution	Co-designed the study, performed experiments and analysed the data, conducted statistical analyses, prepared graphs and tables, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, acted as corresponding author
Contribution (%)	60 %
Date and Signature	05.05.2022 Artur Trzebny

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Słodkiewicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Molecular Ecology Resources* 20 (6) 1486-1504.

DOI: 10.1111/1755-0998.13205

140 MNISW points, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176)

<i>Name of Author</i>	<i>Anna Słodkiewicz-Kowalska</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0002-2402-2031
<i>Affiliation</i>	Department of Biology and Medical Parasitology, Faculty of Medicine I, University of Medical Sciences Fredry 10, 61-701 Poznań, Poland
<i>Contribution</i>	Co-designed the study, provided samples, interpreted the data, performed final approval of the version to be published
<i>Contribution (%)</i>	10 %

Date and Signature

04.05.2022 *Anna Słodkiewicz-Kowalska*

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkowicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Molecular Ecology Resources* 20 (6) 1486-1504.

DOI: 10.1111/1755-0998.13205

140 MNiSW points, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176)

<i>Name of Author</i>	<i>James J. Becnel</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0002-0831-7243
<i>Affiliation</i>	USDA Agricultural Research Service, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology 1600 S.W. 23RD DR Gainesville, Florida, USA
<i>Contribution</i>	Provided samples, interpreted the data, performed final approval of the version to be published
<i>Contribution (%)</i>	5 %

Date and Signature

27 April 2022

James J. Becnel

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkowicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Molecular Ecology Resources* 20 (6) 1486-1504.

DOI: 10.1111/1755-0998.13205

140 MNiSW points, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176)

<i>Name of Author</i>	<i>Neil Sanscrainte</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0002-0891-5278
<i>Affiliation</i>	USDA Agricultural Research Service, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology 1600 S.W. 23RD DR Gainesville, Florida, USA
<i>Contribution</i>	Provided samples, interpreted the data, performed final approval of the version to be published
<i>Contribution (%)</i>	5 %

Date and Signature

NEIL
SANS CRAINTE

Digitally signed by NEIL
SANS CRAINTE
Date: 2022.04.27 09:00:37 -04'00'

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Becnel J.J., Sanscrainte N., Dabert M. (2020) A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). Molecular Ecology Resources 20 (6) 1486-1504.

DOI: 10.1111/1755-0998.13205

140 MNiSW points, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176)

<i>Name of Author</i>	<i>Mirosława Dabert</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0001-5930-3346
<i>Affiliation</i>	Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Molecular Biology Techniques Laboratory, Uniwersytetu Poznanskiego 6 61-614 Poznan, Poland
<i>Contribution</i>	Co-designed the study, supervised the study, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>	20 %
<i>Date and Signature</i>	5.05.2022 

MANUSKRYPT:

*Microsporidians (Microsporidia) parasitic on
mosquitoes (Culicidae) in central Europe
are often multi-host species*

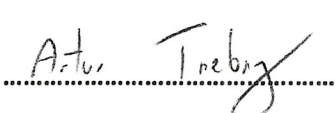
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1579811/v1>

AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Mizera J., Dabert M. Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species. Under review in Scientific Reports.

DOI: 10.21203/rs.3.rs-1579811/v1

140 MNiSW points, IF = 4.476 (IF₅ = 5.134)

Name of Author	Artur Trzebny
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0831-7243
Affiliation	Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
Contribution	Co-designed the study, provided samples, performed experiments and analysed the data, conducted statistical analyses, prepared graphs and tables, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, acted as corresponding author, organized funding for the research
Contribution (%)	75 %
Date and Signature	05.05.2022 

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Mizera J., Dabert M. Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species. Under review in Scientific Reports.

DOI: 10.21203/rs.3.rs-1579811/v1

140 MNiSW points, IF = 4.476 (IF₅ = 5.134)

<i>Name of Author</i>	<i>Justyna Mizera</i>
<i>ORCID</i>	-----
<i>Affiliation</i>	Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
<i>Contribution</i>	Provided samples, performed experiments
<i>Contribution (%)</i>	5 %

Date and Signature

06.05.2022 *Justyna Mizera*

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Mizera J., Dabert M. Microsporidians (Microsporidia) parasitic on mosquitoes (Culicidae) in central Europe are often multi-host species. Under review in Scientific Reports.

DOI: 10.21203/rs.3.rs-1579811/v1

140 MNiSW points, IF = 4.476 (IF₅ = 5.134)

<i>Name of Author</i> <i>Mirosława Dabert</i>	
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0001-5930-3346
<i>Affiliation</i>	Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Molecular Biology Techniques Laboratory, Uniwersytetu Poznanskiego 6 61-614 Poznan, Poland
<i>Contribution</i>	Co-designed the study, supervised the study, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>	20 %
<i>Date and Signature</i>	<u>6.05.2021</u> <u></u>

PUBLIKACJA:

*Microsporidian infection in mosquitoes
(Culicidae) is associated with gut
microbiome composition and predicted gut
microbiome functional content*

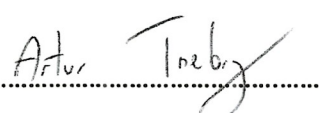
<https://doi.org/10.1007/s00248-021-01944-z>

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Bjorkroth K., Dabert M. (2021) Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content. Microbial Ecology.

DOI: 10.1007/s00248-021-01944-z

100 MNiSW points, IF = 4.552 (IF₅ = 4.770)

<i>Name of Author</i>		<i>Artur Trzebny</i>
<i>ORCID</i>		https://orcid.org/0000-0002-0831-7243
<i>Affiliation</i>		Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
<i>Contribution</i>		Co-designed the study, performed experiments and analysed the data, conducted statistical analyses, prepared graphs and tables, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, acted as corresponding author, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>		70 %
<i>Date and Signature</i>		05.05.2022 

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Słodkiewicz-Kowalska A., Björkroth K., Dabert M. (2021) Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content. Microbial Ecology.

DOI: 10.1007/s00248-021-01944-z

100 MNISW points, IF = 4.552 (IF₅ = 4.770)

Name of Author	Anna Słodkiewicz-Kowalska
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2402-2031
Affiliation	Department of Biology and Medical Parasitology, Faculty of Medicine I, University of Medical Sciences Fredry 10, 61-701 Poznań, Poland
Contribution	Co-designed the study, provided samples, interpreted the data, performed final approval of the version to be published
Contribution (%)	5 %

Date and Signature

04.05.2022 Anna Słodkiewicz-Kowalska

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Björkroth K., Dabert M. (2021) Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content. Microbial Ecology.

DOI: 10.1007/s00248-021-01944-z

100 MNISW points, IF = 4.552 (IF₅ = 4.770)

<i>Name of Author</i>	<i>Johanna Björkroth</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0002-7172-9945
<i>Affiliation</i>	Department of Food Hygiene and Environmental Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki Agnes Sjöberginkatu 2 P.O. Box 66, 00014, Helsinki
<i>Contribution</i>	Interpreted the data, performed final approval of the version to be published
<i>Contribution (%)</i>	5 %

Date and Signature

3rd May 2020

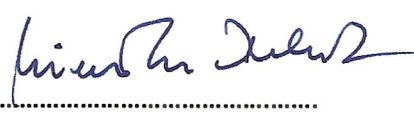


AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Slodkiewicz-Kowalska A., Bjorkroth K., Dabert M. (2021) Microsporidian Infection in Mosquitoes (Culicidae) Is Associated with Gut Microbiome Composition and Predicted Gut Microbiome Functional Content. Microbial Ecology.

DOI: 10.1007/s00248-021-01944-z

100 MNiSW points, IF = 4.552 (IF₅ = 4.770)

<i>Name of Author</i>		<i>Mirosława Dabert</i>
<i>ORCID</i>		https://orcid.org/0000-0001-5930-3346
<i>Affiliation</i>		Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Molecular Biology Techniques Laboratory, Uniwersytetu Poznanskiego 6 61-614 Poznan, Poland
<i>Contribution</i>		Co-designed the study, supervised the study, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>		20 %
<i>Date and Signature</i>		5. 09. 2022 

PUBLIKACJA:

*Metabarcoding reveals low prevalence
of microsporidian infections in castor
bean tick (Ixodes ricinus)*

<https://doi.org/10.1186/s13071-022-05150-9>

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Liberska J., Słodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. (2022) Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). Parasites & Vectors 15 (26).

DOI: 10.1186/s13071-022-05150-9

100 MNiSW points, IF = 3.876 (IF₅ = 3.959)

<i>Name of Author</i>	<i>Artur Trzebny</i>
<i>ORCID</i>	https://orcid.org/0000-0002-0831-7243
<i>Affiliation</i>	Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
<i>Contribution</i>	Co-designed the study, performed experiments and analysed the data, conducted statistical analyses, prepared graphs and tables, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, acted as corresponding author, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>	60 %
<i>Date and Signature</i>	05.05.2022 <i>Art. Trzebny</i>

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Liberska J., Słodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. (2022) Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). *Parasites & Vectors* 15 (26).

DOI: 10.1186/s13071-022-05150-9

100 MNiSW points, IF = 3.876 (IF₅ = 3.959)

<i>Name of Author</i>	<i>Justyna Liberska</i>
<i>ORCID</i>	-----
<i>Affiliation</i>	Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland
<i>Contribution</i>	Co-designed the study, provided samples, morphologically analyzed ticks, interpreted the data, performed final approval of the version to be published, organized founding for the research
<i>Contribution (%)</i>	25 %

Date and Signature

1.05.2022 Justyna Liberska

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Liberska J., Słodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. (2022) Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). *Parasites & Vectors* 15 (26).

DOI: 10.1186/s13071-022-05150-9

100 MNiSW points, IF = 3.876 (IF₅ = 3.959)

Name of Author	Anna Słodkiewicz-Kowalska
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2402-2031
Affiliation	Department of Biology and Medical Parasitology, Faculty of Medicine I, University of Medical Sciences Fredry 10, 61-701 Poznań, Poland
Contribution	Co-designed the study, performed final approval of the version to be published
Contribution (%)	5 %

Date and Signature

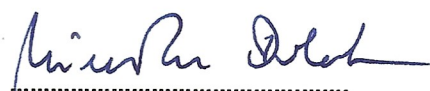
04.05.2022 Anna Słodkiewicz-Kowalska

AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Trzebny A., Liberska J., Slodkiewicz-Kowalska A., Dabert M. (2022) Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). Parasites & Vectors 15 (26).

DOI: 10.1186/s13071-022-05150-9

100 MNiSW points, IF = 3.876 (IF₅ = 3.959)

Name of Author		Mirosława Dabert
ORCID		https://orcid.org/0000-0001-5930-3346
Affiliation		Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Molecular Biology Techniques Laboratory, Uniwersytetu Poznanskiego 6 61-614 Poznan, Poland
Contribution		Co-designed the study, supervised the study, interpreted the data, drafted the manuscript, performed final approval of the version to be published, organized founding for the research
Contribution (%)		20 %
Date and Signature		5.05.2022 

FINANSOWANIE

Badania opisane w tej dysertacji były częściowo finansowane przez (1) Narodowe Centrum Nauki z kierowanego przeze mnie grantu PRELUDIUM19 (2020/37/N/NZ8/01735) pt. „Związki ekologiczne pomiędzy pasożytami koinfekującymi tego samego gospodarza na przykładzie mikrosporydiów infekujących komary”, (2021 – 2024); (2) funduszy statutowych Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM; (3) projektu POWER: Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM (POWR.03.02.00-00-I006/17); (4) projektu ID-UB: Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza (05/IDUB/2019/94); oraz (5) projektu KNOW – Poznańskie Konsorcjum RNA.

Koszty otwartego dostępu do publikacji zostały częściowo pokryte z (1) projektu ID-UB: Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza (05/IDUB/2019/94); (2) subwencji badawczej Wydziału Biologii UAM; oraz (3) funduszy statutowych Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM.

W trakcie studiów doktoranckich otrzymałem również dofinansowania do udziału w międzynarodowych szkoleniach i warsztatach naukowych w ramach (1) projektu ID-UB: Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza (05/IDUB/2019/94); (2) projektu POWER: Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM (POWR.03.02.00-00-I006/17); (3) funduszy statutowych Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM; oraz (4) subwencji badawczej Wydziału Biologii UAM.